

# モノクローナル抗体によるラット中枢神経系における酸性線維芽細胞成長因子含有神経の免疫組織化学的検索

著者	郭 力達
発行年	1998-03-24
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10422/2479">http://hdl.handle.net/10422/2479</a>

氏名・(本籍)	郭 力 達 (中国)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	博士第274号
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位授与年月日	平成10年3月24日
学位論文題目	モノクローナル抗体によるラット中枢神経系における酸性線維芽細胞成長因子含有神経の免疫組織化学的検索
審査委員	主査 教授 今 本 喜久子 副査 教授 岡 部 英 俊 副査 教授 服 部 隆 則

## 論文内容の要旨

### 【目 的】

線維芽細胞成長因子 (FGF) は構造的・機能的に近縁のポリペプチド・ファミリーの総称で、主に中胚葉起源の組織に対して増殖因子活性をもつ。その代表的な構成メンバーである酸性FGF (aFGF) は、免疫組織化学的に脳の特定の神経核の神経細胞や脳室上衣細胞、グリア細胞に局在すると報告されている。しかし、この分布様式は報告によって異なり、まだ一定の見解に達していない。従来の研究ではポリクローナル抗体を用いているため、化学構造の類似した他のFGFとの免疫交叉反応の可能性を否定できない。本研究では、神経内在性のaFGFを認識できるモノクローナル抗体の作製を行い、これを用いて免疫組織化学的にラット中枢神経系の細胞分布様式を検索した。

### 【方 法】

1. aFGFモノクローナル抗体の作製：ヒトのリコンビナントaFGFを0.5%グルタルアルデヒド水溶液中でポリマー結合反応させ、これを抗原として雌性マウスを免疫した。血清の抗体価はスポットテストとラットの脳切片を用いた免疫組織化学染色で検定した。最も高力価のマウスの脾臓を摘出しミエロマ細胞株 (P 3 U 1) と細胞融合した。抗体のスクリーニングは抗血清と同様の方法によった。
2. ウェスタンブロット解析：ラットの新鮮脳と脊髄組織の可溶性抽出液を、リコンビナントaFGFおよび抗原調整品とともに、15%ポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけ、ポリビニリデン・ジフルオリド膜に転写して、aFGFモノクローナル抗体と反応させた。
3. 免疫組織化学法：ラットを深麻酔下で灌流固定した。脳および脊髄を速やかに摘出し、組織塊を更に1-2日間浸漬固定、次いで15%蔗糖液で洗浄後、クリオスタット切片を作製した。浮遊切片をaFGFモノクローナル抗体と反応させABC法で染色した。

### 【結 果】

1. aFGFモノクローナル抗体の特異性：本研究で高力価のモノクローナル抗体Mab676が得られた。ウェスタンブロット法では、この抗体はリコンビナントaFGF標品で15.5kDaの単一バンドを、抗原物質では15.5kDaのバンドに加え31kDaと46.5kDaのバンドを検出した。脳および脊髄の可溶性分画では約17kDaの単一バンドを検出した。
2. ラットの脳・脊髄におけるaFGF免疫陽性構造の分布：脳と脊髄の広い領域にかけて、aFGFモノクローナル抗体で陽性染色される神経細胞体と神経突起の分布を観察した。脳室上衣細胞の一部も陽性であったが、グリア細胞やタニサイトは染色されなかった。脳における陽性神経細胞集団の好例は動眼神経核で、この抗体によって微細な構造が明瞭に描出出来た。嗅球では外網状層と僧帽細胞層に小型の陽性神経細胞体と突起が分布していた。大脳皮質では、内側の帯状束皮質内投射に添って放射状に分布する紡錘形小型細胞が観察された。その他の新皮質領域では小型の紡錘形細胞が散在性に観察された。視床下部の諸核に陽性細胞が分布していたが、とくに外

側野では中型から大型の濃染神経細胞と細い線維が豊富に検出された。海馬では、少数の小型で紡錘形の陽性神経細胞がCA1からCA3に認められた。新線条体では無棘の樹状突起をもつ大型細胞が、脊髄では前角の運動神経細胞とその樹状突起、さらに前根を形成する神経束が強陽性であった。

#### 【考 察】

本研究で作成したaFGFモノクローナル抗体Mab676は、抗原の出発材料として分子量約15.5 kDaのヒト・リコンビナントaFGFを用いて得られた。ウェスタンブロット解析ではこの抗体は15.5kDaの抗原のaFGFを認識するとともにラット脳および脊髄の粗精製標品で野生型aFGF(1-154)に相当する約17kDaの単一バンドを検出した。通常のスプレッドテストに加え、ラット脳切片を用いる免疫組織化学的選定法、すなわち神経局在性のaFGFに対する検出感度を指標にした抗血清およびモノクローナル抗体の選定法を採用したことによって、高力価で特異性の高い抗体が得られたものと考えられる。

既報告のポリクローナル抗体によるaFGF陽性ニューロンの分布様式は、今回の研究でも全て確認できた。大脳皮質・大脳基底核・視床・視床下部・脳幹・小脳・脊髄など特定の諸核における分布様式の特徴は、コリン系、モノアミン系、第一次感覚神経との共存関係を示唆していた。上記の分布に加えて、モノクローナル抗体を用いることによって新たな陽性神経細胞グループの存在が明らかとなった。すなわち、嗅球・頭頂葉皮質・側頭葉皮質などである。今後、mRNAレベルでの検証が必要である。

#### 【結 論】

抗体価検定法としてスプレッドテストに加え、免疫組織化学的検定法を採用したことにより、特異性の高い高感度のaFGFモノクローナル抗体の作製に成功した。aFGF免疫活性は中枢神経系に豊富に認められ、新たなaFGF陽性神経細胞グループの存在が明らかとなった。

### 論文審査の結果の要旨

酸性線維芽細胞成長因子(aFGF)の脳内局在については、従来研究者によって異なる結果が得られており、その確定にはモノクローナル抗体の作製が望まれていた。本研究は、aFGF抗原の調製にグルタルアルデヒドを用いると同時に抗体スクリーニングに免疫組織化学法を採用することにより、神経細胞に存在するaFGFを高感度に検出できる抗体の作製に成功したものである。この抗体を用いて免疫組織化学的にラット脳におけるaFGF陽性ニューロンの局在を検討し、以下の結果を得た。aFGF免疫活性はグリアや脳室上皮細胞には認められず、大脳皮質・大脳基底核・視床・視床下部・脳幹など特定の神経細胞群のみに観察された。本研究により、従来のいくつかの報告が再確認されたばかりでなく、嗅球・頭頂葉皮質・側頭葉皮質など新しい分布が明らかとなった。以上の研究は中枢神経系におけるaFGFの機能的意義とくに神経細胞の生存維持機構における役割を解明する点において寄与するものといえる。

したがって、本論文は博士(医学)の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成10年2月6日実施の論文内容と、それに関連した試問を受け、合格と認められたものである。